



PCT

特許協力条約に基づいて公開された国際出願

<p>(51) 国際特許分類7 A61K 45/00, 31/4439, A61P 35/04</p>	<p>A1</p>	<p>(11) 国際公開番号 WO00/59541  (43) 国際公開日 2000年10月12日(12.10.00)</p>
<p>(21) 国際出願番号 PCT/JP00/01302 (22) 国際出願日 2000年3月3日(03.03.00) (30) 優先権データ 特願平11/89803 1999年3月30日(30.03.99) JP (71) 出願人 (米国を除くすべての指定国について) 三共株式会社(SANKYO COMPANY, LIMITED)[JP/JP] 〒103-8426 東京都中央区日本橋本町3丁目5番1号 Tokyo, (JP) (72) 発明者; および (75) 発明者/出願人 (米国についてののみ) 福井泰久(FUKUI, Yasuhisa)[JP/JP] 伊原さよ子(IHARA, Sayoko)[JP/JP] 永田諭志(NAGATA, Satoshi)[JP/JP] 〒113-0032 東京都文京区弥生1丁目1番1号 東京大学農学部内 Tokyo, (JP) (74) 代理人 大野彰夫, 外(OONO, Akio et al.) 〒140-8710 東京都品川区広町1丁目2番58号 三共株式会社内 Tokyo, (JP)</p>		<p>(81) 指定国 CA, US  添付公開書類 国際調査報告書</p>
<p>(54) Title: PREVENTIVES OR REMEDIES FOR CANCER AND METHOD FOR SCREENING THE SAME (54) 発明の名称 ガンの予防又は治療薬及びそのスクリーニング方法 (57) Abstract [Object]: to provide novel remedies for cancer and a process for producing the remedies. [Means for Solution]: preventives or remedies for cancer containing p38 inhibitors and a method for screening a compound with the use of the differentiation state of cancer cells.</p> <p style="text-align: center;">BEST AVAILABLE COPY</p>		

(57)要約

[課題]

新たなガン治療薬及び治療薬の創製方法を提供する。

[解決手段] p38 阻害薬を含有するガンの予防又は治療薬及びガン化細胞の分化状

態を指標とした化合物のスクリーニング方法を提供する。

PCTに基づいて公開される国際出願のパンフレット第一頁に掲載されたPCT加盟国を同定するために使用されるコード(参考情報)

AE	アラブ首長国連邦	DM	ドミニカ	KZ	カザフスタン	RU	ロシア
AG	アンティグア・バーブーダ	DZ	アルジェリア	LC	セントルシア	SD	スーダン
AL	アルバニア	EE	エストニア	LI	リヒテンシュタイン	SE	スウェーデン
AM	アルメニア	ES	スペイン	LK	スリ・ランカ	SG	シンガポール
AT	オーストリア	FI	フィンランド	LR	リベリア	SI	スロヴェニア
AU	オーストラリア	FR	フランス	LS	レソト	SK	スロヴァキア
AZ	アゼルバイジャン	GA	ガボン	LT	リトアニア	SL	シエラ・レオネ
BA	ボスニア・ヘルツェゴビナ	GB	英国	LU	ルクセンブルグ	SN	セネガル
BB	バルバドス	GD	グレナダ	LV	ラトヴィア	SZ	スワジランド
BE	ベルギー	GE	グルジア	MA	モロッコ	TD	チャード
BF	ブルキナ・ファソ	GH	ガーナ	MC	モナコ	TG	トーゴ
BG	ブルガリア	GM	ガンビア	MD	モルドヴァ	TJ	タジキスタン
BJ	ベナン	GN	ギニア	MG	マダガスカル	TM	トルクメニスタン
BR	ブラジル	GR	ギリシャ	MK	マケドニア旧ユーゴスラヴィア	TR	トルコ
BY	ベラルーシ	GW	ギニア・ビサウ		共和国	TT	トリニダード・トバゴ
CA	カナダ	HR	クロアチア	ML	マリ	TZ	タンザニア
CF	中央アフリカ	HU	ハンガリー	MN	モンゴル	UA	ウクライナ
CG	コンゴ	ID	インドネシア	MR	モーリタニア	UG	ウガンダ
CH	スイス	IE	アイルランド	MW	マラウイ	US	米国
CI	コートジボワール	IL	イスラエル	MX	メキシコ	UZ	ウズベキスタン
CM	カメルーン	IN	インド	MZ	モザンビーク	VN	ベトナム
CN	中国	IS	アイスランド	NE	ニジェール	YU	ユーゴスラヴィア
CR	コスタ・リカ	IT	イタリア	NL	オランダ	ZA	南アフリカ共和国
CU	キューバ	JP	日本	NO	ノルウェー	ZW	ジンバブエ
CY	キプロス	KE	ケニア	NZ	ニュージーランド		
CZ	チェコ	KG	キルギスタン	PL	ポーランド		
DE	ドイツ	KP	北朝鮮	PT	ポルトガル		
DK	デンマーク	KR	韓国	RO	ルーマニア		

## 明 細 書

## 〔発明の名称〕

ガンの予防又は治療薬及びそのスクリーニング方法

## 〔技術分野〕

- 5 本発明は、新規作用に基づくガンの予防又は治療薬及びそのスクリーニング方法に関する。

## 〔背景技術〕

- ガンにおいて、転移の可能性が少なく、外科的な手術により容易に除去可能である非浸潤性ガンと、外科的な治療が困難である転移可能性の高い浸潤性ガンが臨床  
10 病理学的に知られており、これら2種のガンの性質はガン細胞の分化状態を反映し、非浸潤性ガンでは分化型の細胞種、浸潤性ガンにおいては未分化型の細胞種であると考えられている。

- しかし、浸潤性ガンに対する治療法は、その転移能の高さにより完全な外科的な除去が不可能であるため、他の療法に頼るほかなく、完全な治癒を期待することが  
15 できなかった。

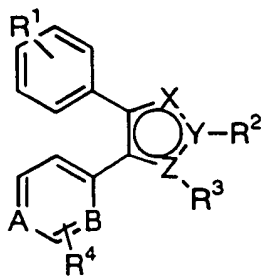
浸潤性ガンを外科的な治療可能な非浸潤性ガンへと転換するような薬剤、及び、ガン細胞が浸潤性ガンに変換されることを阻害するような薬剤は、かかる臨床上の治療の困難性を予防又は解決することができると考えられ、いまだかつて存在しないこのような薬剤の開発が非常に待ち望まれていた。

- 20 〔発明の開示〕

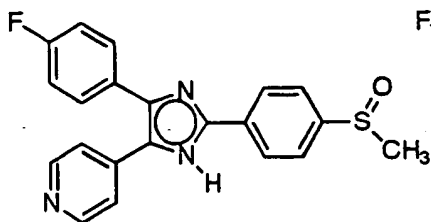
- 本発明者らは、上記課題を解決するために鋭意研究を重ねた結果、p38 阻害剤が分化型ガン細胞の未分化型ガン細胞への変換を阻害し、一方、未分化型ガン細胞を分化型ガン細胞へと変換することを発見し、p38 阻害剤がガン、特に未分化型ガンの予防又は治療剤として有効であることを見いだした。更に本発明者らは、かかる  
25 機作を用いてガン化細胞の分化状態、特に p38 チロシンリン酸化されたガン細胞の分化状態を指標としたスクリーニング方法を開発すると共に、スクリーニングにより得られる化合物がガンの予防又は治療剤として有効であることを発見し、併せて、p38 を阻害することにより未分化型ガン細胞を分化型ガン細胞に変換し得ること見

いだして本発明を完成するに至った。

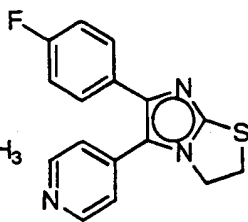
- 即ち、本発明は、(1)p38 阻害剤を含有するガンの予防又は治療薬であり、(2) p38 阻害剤を含有する未分化型ガンの予防又は治療薬であり、(3)未分化型ガンを分化型ガンに変換することを特徴とする p38 阻害剤を含有するガンの予防又は治療薬であり、(4)未分化型ガンの発生を阻害することを特徴とする p38 阻害剤を含有するガンの予防又は治療薬であり、(5) (a) ガン化細胞を被検化合物の存在又は非存在下培養する手段及び(b)一定時間経過後の分化状態を判定する手段からなるスクリーニング方法であり、(6) (a1) p38 チロシンリン酸化が亢進したガン化細胞を被検化合物の存在又は非存在下培養する手段及び(b)一定時間経過後の分化状態を判定する手段からなるスクリーニング方法であり、(7) (5)乃至(6)のスクリーニング方法を用いて得られる化合物であり、(8) (5)乃至(6)のスクリーニング方法により得られる化合物を有効成分として含有するガンの予防又は治療薬であり、(9) (5)乃至(6)のスクリーニング方法を用いて得られる化合物を有効成分として含有する未分化型ガンの予防又は治療薬であり、(10)未分化型ガンを分化型ガンに変換することを特徴とする、(5)乃至(6)のスクリーニング方法を用いて得られる化合物を有効成分として含有するガンの予防薬又は治療薬であり、(11)未分化型ガンの発生を阻害することを特徴とする、(5)乃至(6)のスクリーニング方法を用いて得られる化合物を有効成分として含有するガンの予防又は治療薬であり、(12)未分化型ガン細胞を分化型ガン細胞に変換する際 p38 を阻害する方法である。
- 20 本発明の p38 阻害剤は、p38 阻害作用を持つものであれば特に限定はないが、例えば、Expert Opin. Ther. Patents, 7, 729(1997)に挙げられているように 5 員環ヘテロアリアルを含むものとして、以下の一般式



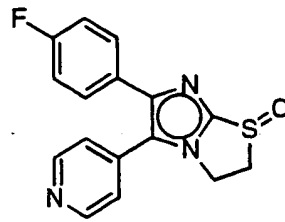
- (式中、Aは窒素原子又はCH基を示し、Bは窒素原子又はCH基を示し、Xは窒素原子、酸素原子、硫黄原子、炭素原子、CH基又はNH基を示し、Yは窒素原子、酸素原子、硫黄原子、炭素原子、CH基又はNH基を示し、Zは窒素原子、酸素原子、硫黄原子、炭素原子、CH基又はNH基を示し、R¹はアルキル基、アルコキシ基又はハロゲン原子を示し、R²は水素原子、置換基を有しても良いアルキル基、アルキルチオ基、アルキルスルフィニル基、置換基を有しても良いアリール基又は置換基を有してもよいピペリジノ基を示し、R³は水素原子、置換基を有しても良いアルキル基又は置換基を有しても良いシクロアルキル基を示し、R⁴は水素原子、アルコキシ基、置換基を有しても良いアミノ基を示す。又、R²とR³は縮合して環を形成してもよい。)
- 5
- 10
- で表される化合物又はその薬理上許容される塩であり、より好適には以下の化合物A乃至T



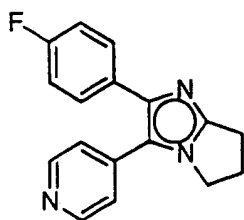
化合物A



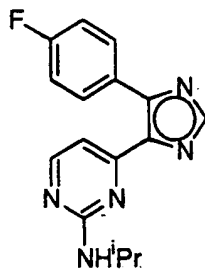
化合物B



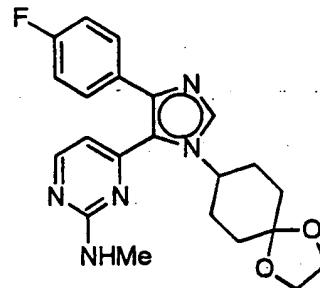
化合物C



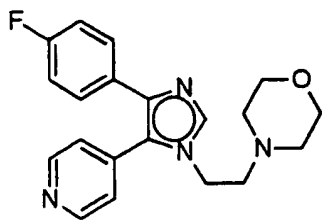
化合物D



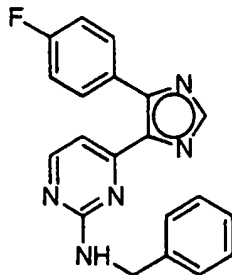
化合物E



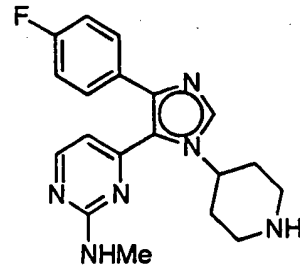
化合物F



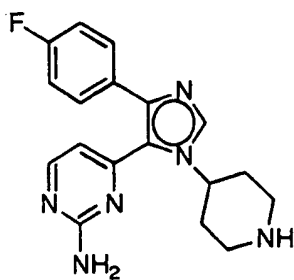
化合物G



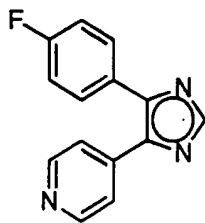
化合物H



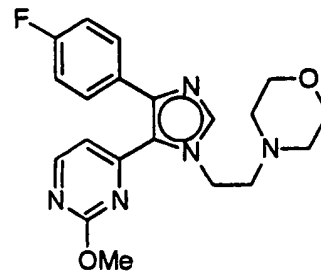
化合物I



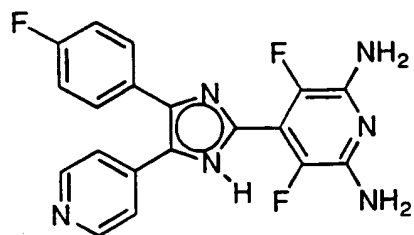
化合物J



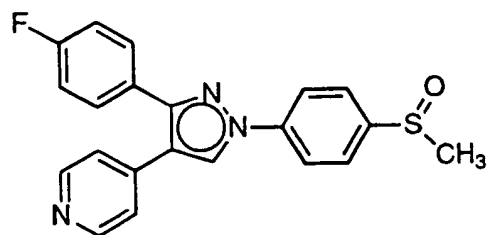
化合物K



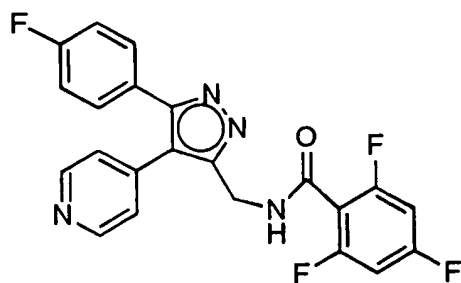
化合物L



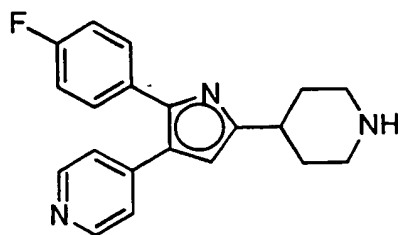
化合物M



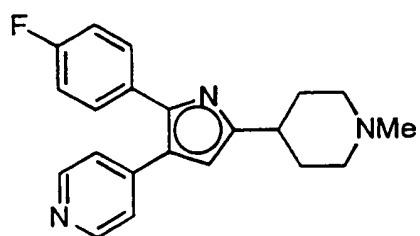
化合物N



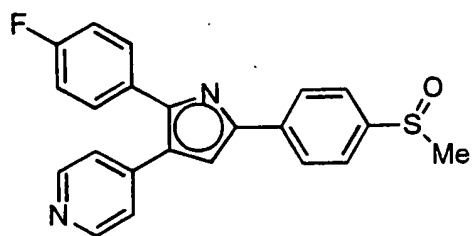
化合物O



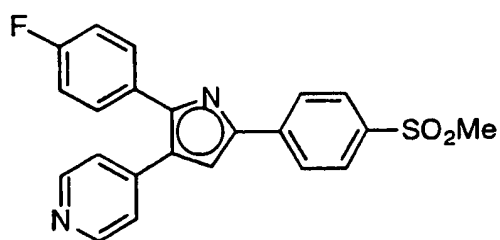
化合物P



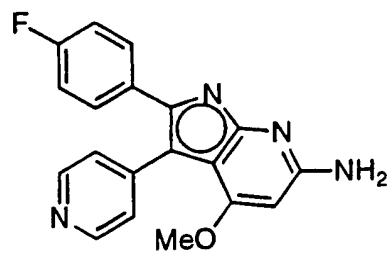
化合物Q



化合物R



化合物S



化合物T

又はその薬理上許容される塩を挙げることができる。

上記において「ハロゲン原子」とは、例えば、フッ素原子、塩素原子、臭素原子

又はヨウ素原子のことをいい、好適には、フッ素原子である。

上記において「アルキル基」とは、例えば、メチル、エチル、*n*-プロピル、イソプロピル、*n*-ブチル、イソブチル、*s*-ブチル、*tert*-ブチル、*n*-ペンチル、イソペンチル、2-メチルブチル、ネオペンチル、1-エチルプロピル、*n*-ヘキシル、イソヘキシル、4-メチルペンチル、3-メチルペンチル、2-メチルペンチル、1-メチルペンチル、3, 3-ジメチルブチル、2, 2-ジメチルブチル、1, 1-ジメチルブチル、1, 2-ジメチルブチル、1, 3-ジメチルブチル、2, 3-ジメチルブチル、2-エチルブチルのような炭素数1乃至6個の直鎖又は分枝鎖アルキル基を示し、好適には炭素数1乃至4個の直鎖又は分枝鎖アルキル基である。

上記において「シクロアルキル基」とは、例えば、シクロプロピル、シクロブチル、シクロペンチル、シクロヘキシル、シクロヘプチル、ノルボルニル、アダマンチルのような縮環していてもよい3乃至10員飽和環状炭化水素基を挙げることができ、好適には5乃至10員飽和環状炭化水素基である。

上記において「アルキルチオ基」とは前記「アルキル基」が硫黄原子に結合した基をいい、例えば、メチルチオ、エチルチオ、*n*-プロピルチオ、イソプロピルチオ、*n*-ブチルチオ、イソブチルチオ、*s*-ブチルチオ、*tert*-ブチルチオ、*n*-ペンチルチオ、イソペンチルチオ、2-メチルブチルチオ、ネオペンチルチオ、1-エチルプロピルチオ、*n*-ヘキシルチオ、イソヘキシルチオ、4-メチルペンチルチオ、3-メチルペンチルチオ、2-メチルペンチルチオ、1-メチルペンチルチオ、3, 3-ジメチルブチルチオ、2, 2-ジメチルブチルチオ、1, 1-ジメチルブチルチオ、1, 2-ジメチルブチルチオ、1, 3-ジメチルブチルチオ、2, 3-ジメチルブチルチオ、2-エチルブチルチオのような炭素数1乃至6個の直鎖又は分枝鎖アルキルチオ基を示し、好適には炭素数1乃至4個の直鎖又は分枝鎖アルキルチオ基である。

上記において「アルキルスルフィニル基」とは上記「アルキル基」がスルフィニル基に結合した基をいい、例えば、メチルスルフィニル、エチルスルフィニル、*n*-プロピルスルフィニル、イソプロピルスルフィニル、*n*-ブチルスルフィニル、



イソブチルスルフィニル、s-ブチルスルフィニル、tert-ブチルスルフィニル、  
n-ペンチルスルフィニル、イソペンチルスルフィニル、2-メチルブチルスル  
フィニル、ネオペンチルスルフィニル、1-エチルプロピルスルフィニル、n-ヘキ  
シルスルフィニル、イソヘキシルスルフィニル、4-メチルペンチルスルフィニル、  
5 3-メチルペンチルスルフィニル、2-メチルペンチルスルフィニル、1-メチル  
ペンチルスルフィニル、3, 3-ジメチルブチルスルフィニル、2, 2-ジメチル  
ブチルスルフィニル、1, 1-ジメチルブチルスルフィニル、1, 2-ジメチルブ  
チルスルフィニル、1, 3-ジメチルブチルスルフィニル、2, 3-ジメチルブチ  
ルスルフィニル、2-エチルブチルスルフィニルのような炭素数1乃至6個の直鎖  
10 又は分枝鎖アルキルスルフィニル基を示し、好適には炭素数1乃至4個の直鎖又は  
分枝鎖アルキルスルフィニル基である。

上記において「アルコキシ基」とは、例えば、メトキシ、エトキシ、プロポキシ、  
イソプロポキシ、ブトキシ、イソブトキシ、s-ブトキシ、tert-ブトキシ、ペン  
トキシ、イソペントキシ、2-メチルブトキシ、ネオペントキシ、ヘキシルオキシ、  
15 4-メチルペントキシ、3-メチルペントキシ、2-メチルペントキシ、3, 3-  
ジメチルブトキシ、2, 2-ジメチルブトキシ、1, 1-ジメチルブトキシ、1,  
2-ジメチルブトキシ、1, 3-ジメチルブトキシ又は2, 3-ジメチルブトキシ  
のような炭素数1乃至6個の直鎖又は分枝鎖アルコキシ基であり得、好適には、メ  
トキシ基、エトキシ基又はtert-ブトキシ基である。

20 上記において「アリール基」とは、例えば、フェニル、インデニル、ナフチル、  
フェナンスレニル、アントラセニルのような炭素数5乃至14個の芳香族炭化水素  
基を挙げることができ、好適にはフェニル基である。

本発明のスクリーニング方法であるガン化細胞の分化状態を指標としたスクリー  
ニング方法においては、例えば、文献記載の方法（例えば、J. Biol. Chem. 27,  
25 16089(1997)等）に準じ、分化型ガン細胞株である HCC2998 又は MKN45 を Cre  
recombinase 発現型アデノウイルス（以下、「Cre-Adenovirus」という。）存在下、  
活性型 PI3 キナーゼを発現し得るように調製した細胞株 HCC2998/BD110 又は  
MKN45/BD110 を用いて行うことができる。驚くべきことに、Cre-Adenovirus 存在下

で活性型 PI3 キナーゼを発現するガン細胞株は、p38 チロシンリン酸化が亢進し、分化型から未分化型へと変化する。本発明のスクリーニング方法は、Cre-Adenovirus 存在下で活性型 PI3 キナーゼを発現するガン細胞株を被検化合物の存在下又は非存在下培養した細胞の分化状態の比較によって行われる。

- 5      さらに、本発明のスクリーニング方法は、未分化型ガン細胞株である NUGC4 を用いても、被検化合物の存在下又は非存在下培養した細胞の分化状態の比較によって行うことができる。

本発明に用いられ得る細胞株 NUGC4 は、本発明者らによって初めて p38 チロシンリン酸化が亢進していることが明らかにされた。

- 10      なお、本発明に用いられる細胞株 NUGC4 は、番号 TKG0049 として、東北大学加齢医学研究所附属医用細胞資源センターより入手可能であり、細胞株 MKN45 は、番号 JCRB0254 として、財団法人ヒューマンサイエンス振興財団ヒューマンサイエンス研究資源バンクより入手可能である。

- 15      本発明のスクリーニング方法において、分化状態を判定する手段とは、分化型細胞と未分化型細胞とを判定することをいい、そのような判定する手段であってスクリーニング方法に用いられるものであれば特に限定されないが、好適には、分化型細胞と未分化型細胞を形態の違いにより判定する手段であり、より好適には、細胞を形態により器壁に付着する形態を取る細胞と器壁に付着せず浮遊する細胞とに区分し、前者を分化型細胞、後者を未分化型細胞と判定する手段である。

- 20      本発明の組成物の形態としては、例えば、錠剤、カプセル剤、顆粒剤、散剤若しくはシロップ剤等による経口投与又は注射剤若しくは座剤等による非経口投与を挙げることができる。これらの製剤は、賦形剤（例えば、乳糖、白糖、葡萄糖、マンニトール、ソルビトールのような糖誘導体；トウモロコシデンプン、バレイショデンプン、 $\alpha$  澱粉、デキストリンのような澱粉誘導体；結晶セルロースのようなセルロース誘導体；アラビアゴム；デキストラン；プルランのような有機系賦形剤；及び  
25      軽質無水珪酸、合成珪酸アルミニウム、珪酸カルシウム、メタ珪酸アルミン酸マグネシウムのような珪酸塩誘導体；磷酸水素カルシウムのような磷酸塩；炭酸カルシウムのような炭酸塩；硫酸カルシウムのような硫酸塩等の無機系賦形剤を挙げる

- ことができる。)、滑沢剤 (例えば、ステアリン酸、ステアリン酸カルシウム、ステアリン酸マグネシウムのようなステアリン酸金属塩；タルク；コロイドシリカ；ビーガム、ゲイ蠟のようなワックス類；硼酸；アジピン酸；硫酸ナトリウムのような硫酸塩；グリコール；フマル酸；安息香酸ナトリウム；DLロイシン；脂肪酸ナトリウム塩；ラウリル硫酸ナトリウム、ラウリル硫酸マグネシウムのようなラウリル硫酸塩；無水珪酸、珪酸水和物のような珪酸類；及び、上記澱粉誘導体を挙げる  
5 ことができる。)、結合剤 (例えば、ヒドロキシプロピルセルロース、ヒドロキシプロピルメチルセルロース、ポリビニルピロリドン、マクロゴール、及び、前記賦形剤と同様の化合物を挙げる  
10 ことができる。)、崩壊剤 (例えば、低置換度ヒドロキシプロピルセルロース、カルボキシメチルセルロース、カルボキシメチルセルロースカルシウム、内部架橋カルボキシメチルセルロースナトリウムのようなセルロース誘導体；カルボキシメチルスターチ、カルボキシメチルスターチナトリウム、架橋ポリビニルピロリドンのような化学修飾されたデンプン・セルロース類を挙げる  
15 ことができる。)、安定剤 (メチルパラベン、プロピルパラベンのようなパラオキシ安息香酸エステル類；クロロブタノール、ベンジルアルコール、フェニルエチルアルコールのようなアルコール類；塩化ベンザルコニウム；フェノール、クレゾールの  
20 ようなフェノール類；チメロサール；デヒドロ酢酸；及び、ソルビン酸を挙げる  
25 ことができる。)、矯味矯臭剤 (例えば、通常使用される、甘味料、酸味料、香料等を挙げる  
30 ことができる。)、希釈剤等の添加剤を用いて周知の方法で製造される。
- 20 その使用量は症状、年齢、投与方法等により異なるが、例えば、経口投与の場合には、成人に対して1日あたり、下限として0.01mg/kg (好ましくは0.1mg/kg)、上限として、50mg/kg (好ましくは10mg/kg)を1回又は数回に分けて、症状に応じて投与することが望ましい。静脈内投与の場合には、成人に対して1日あたり、下限として0.001mg/kg (好ましくは0.01mg/kg)、上限として、10mg/kg (好ましくは5mg/kg)を1回又は数回に分けて、症状に応じて投与することが望ましい。

[図面の簡単な説明]

[図1]

培養前の NUGC4 の未分化状態が、化合物 A の非存在下では変化しない（左側）のに対し、化合物 A の存在下では分化型へと変換されている（右側；10 日培養後）ことを示す。

[図 2]

- 5 化合物 A の非存在下では、活性型 PI3 キナーゼの発現に伴って HCC2998 が未分化型へと変換される（上段）のに対し、化合物 A の存在下では、未分化型への変換が阻害される（下段）ことを示す。図中、LacZ とは活性型 PI3 を発現していない細胞株を表し、Cre とは活性型 PI3 を発現している細胞株を表す。

[図 3]

- 10 化合物 A の非存在下では、活性型 PI3 キナーゼの発現に伴って MKN45 が未分化型へと変換される（上段）のに対し、化合物 A の存在下では、未分化型への変換が阻害される（下段）ことを示す。図中、LacZ とは活性型 PI3 を発現していない細胞株を表し、Cre とは活性型 PI3 を発現している細胞株を表す。

[発明を実施するための最良の形態]

- 15 以下に実施例を挙げて本発明をさらに詳細に説明する。

[実施例]

[実施例 1] HCC2998/BD110 を用いたガン治療薬の探索

- 20 HCC2998/BD110細胞を $1 \times 10^5$ 個3cmシャーレにRPMI1640(10 % calf serum添加)中で培養し、1 日後m. o. i. 50にてCre-Adenovirusを感染させる。この時被検化合物を存在させたものと存在させないものの形態変化を観察する。未分化型への移行を阻止する化合物をガンの予防又は治療薬として選別する。

[実施例 2] MKN45/BD110を用いたガン治療薬の探索

- 25 MKN45/BD110細胞を $1 \times 10^5$ 個3cmシャーレにRPMI1640(10 % calf serum添加)中で培養し、1 日後m. o. i. 50にてCre-Adenovirusを感染させる。この時被検化合物を存在させたものと存在させないものの形態変化を観察する。未分化型への移行を阻止する化合物をガンの予防又は治療薬として選別する。

[実施例 3] NUGC4を用いたガン治療薬の探索

NUGC4を $1 \times 10^5$ 個3cmシャーレにRPMI1640(10 % calf serum添加)中で、被検化合物

を添加後 10 日間培養した。細胞が器壁に接着するようになり、分化型癌細胞様の形態へと移行させる化合物をガンの予防又は治療薬として選別する。

[実施例4] p38阻害剤による未分化型ガン細胞の分化型細胞への転換

- 5 NUGC4を $1 \times 10^5$ 個3cmシャーレにRPMI1640(10 % calf serum添加)中で培養し、p38阻害剤を添加後 10 日間培養した。細胞が器壁に接着するようになり、分化型癌細胞様の形態をとる。

[実施例5] p38阻害剤による分化型ガン細胞の未分化型細胞への転換阻害

- 10 MKN45/BD110細胞を $1 \times 10^5$ 個3cmシャーレにRPMI1640(10 % calf serum添加)中で培養し、1日後m.o.i. 50にてCre-Adenovirusを感染させる。この時p38阻害剤を存在させたものと存在させないものの形態変化を観察する。p38阻害剤を加えたものは未分化型への移行が阻止される。

[実施例6] 化合物Aによる未分化型ガン細胞の分化型細胞への転換

- 15 NUGC4を $1 \times 10^5$ 個3cmシャーレにRPMI1640(10 % calf serum添加)中で培養し、化合物Aを添加後 10 日間培養した。細胞が器壁に接着するようになり、分化型癌細胞様の形態をとった。[図1]

[実施例7] 化合物Aによる分化型ガン細胞の未分化型細胞への転換阻害

- 20 HCC2998/BD110細胞を $1 \times 10^5$ 個3cmシャーレにRPMI1640(10 % calf serum添加)中で培養し、1日後m.o.i. 50にてCre-Adenovirusを感染させる。この時化合物Aを存在させたものと存在させないものの形態変化を観察する。化合物Aを加えたものは未分化型への移行が阻止された。[図2]

[実施例8] 化合物Aによる分化型ガン細胞の未分化型細胞への転換阻害

- 25 MKN45/BD110細胞を $1 \times 10^5$ 個3cmシャーレにRPMI1640(10 % calf serum添加)中で培養し、1日後m.o.i. 50にてCre-Adenovirusを感染させる。この時化合物Aを存在させたものと存在させないものの形態変化を観察する。化合物Aを加えたものは未分化型への移行が阻止された。[図3]

[実施例9] ガンの予防又は治療薬の探索

スクリーニングする化合物(1 mg/ml程度、MeOH:DMSO=7:3溶液)を $2 \mu$ lずつ96穴プレートにあらかじめ分取しておく。HCC2998/BD110細胞をプレートよりはがし、

PBSで洗浄後、RPMI1640倍地懸濁液中でm. o. i. 30にてCre-Adenovirusを1時間感染させる。この感染細胞を10%血清を含むRPMI1640倍地で10,000cells/mlになるように希釈後、0.2mlずつ96穴プレートにまく。1日後、形態を観察し、未分化型への移行を阻止する化合物をガンの予防薬又は治療薬として選別する。

5     [参考例] NUGC4細胞におけるp38チロシンリン酸化の亢進

未分化ガン細胞株NUGC4、KATOIII及びその他の分化型胃癌細胞株SCH、SH10-TCの総タンパク質 (50 micro gram) を10%ポリアクリルアミドゲルに電気泳動し、ウエスタンブロッティングを行った。3%スキムミルクを含む緩衝液 (1% tween20を含む等張トリス緩衝液) でブロッティングを行った後、同じ溶液中でチロシンリン酸化p38抗体を用いて活性化p38を、また、p38抗体を用いてp38を検出した。

10     未分化細胞株特異的にp38の活性化が見られる。

[製剤例]

[製剤例1] (カプセル剤)

消化性油状化合物、例えば、大豆油、綿実油又はオリーブ油中に入れた、化合物

15     Aの混合物を調整し、正置換ポンプでゼラチン中に注入して、100mgの活性成分を含有するソフトカプセルを得、洗浄後、乾燥する。

[製剤例2] (錠剤)

常法に従って、100mgの化合物A、0.2mgのコロイド性二酸化珪素、5mgのステアリン酸マグネシウム、275mgの微結晶性セルロース、11mgの

20     デンプン及び98.8mgのラクトースを用いて製造する。

尚、所望により、剤皮を塗布する。

[製剤例3] (注射剤)

1. 5重量%の化合物Bを、10容量%のプロピレングリコール中で攪拌し、次いで、注射用水で一定容量にした後、滅菌して製造する。

25     [製剤例4] (懸濁剤)

精製水5ml中に、100mgの微粉化した化合物A、100mgのナトリウムカルボキシメチルセルロース、5mgの安息香酸ナトリウム、1.0gのソルビトール溶液 (日本薬局方) 及び0.025mlのバニリンを含有するように製造する。

## 〔産業上の利用の可能性〕

- 本発明の p38 阻害剤を含有する組成物は、p38 を阻害することによって、未分化型ガン細胞を分化型ガン細胞へと変換すること、或いは、分化型ガン細胞が未分化型へと変化することを阻害することによって、ガンの予防及び治療することが可能
- 5 である。本発明のガン化細胞の分化状態を指標とした化合物のスクリーニング方法は、ガンの予防又は治療薬のスクリーニング方法として有用である。また、本発明の p38 チロシンリン酸化が亢進したガン化細胞の分化状態を指標とした化合物のスクリーニング方法はガンの予防又は治療薬のスクリーニング方法として有用である。
- 加えて、これらスクリーニング方法によって得られる化合物はガンの予防又は治療
- 10 薬として有用である。さらに、本発明の p38 阻害の方法は、未分化型ガン細胞を分化型ガン細胞に変換する方法として有用である。

## 請 求 の 範 囲

1. p38 阻害剤を含有するガンの予防又は治療薬。

2. p38 阻害剤を含有する未分化型ガンの予防又は治療薬。

5

3. 未分化型ガンを分化型ガンに変換することを特徴とする p38 阻害剤を含有するガンの予防又は治療薬。

4. 未分化型ガンの発生を阻害することを特徴とする p38 阻害剤を含有するガンの予防又は治療薬。

10

5. 以下の手段 (a) 乃至 (b) からなるスクリーニング方法。

(a) ガン化細胞を被検化合物の存在又は非存在下培養する手段

(b) 一定時間経過後の分化状態を判定する手段

15

6. 以下の手段 (a1) 乃至 (b) からなるスクリーニング方法。

(a1) p38 チロシンリン酸化が亢進したガン化細胞を被検化合物の存在又は非存在下培養する手段

(b) 一定時間経過後の分化状態を判定する手段

20

7. 請求項 5 乃至 6 記載のスクリーニング方法により得られる化合物。

8. 請求項 5 乃至 6 記載のスクリーニング方法により得られる化合物を有効成分として含有するガンの予防又は治療薬。

25

9. 請求項 5 乃至 6 記載のスクリーニング方法により得られる化合物を有効成分として含有する未分化型ガンの予防又は治療薬。



10. 未分化型ガンを分化型ガンに変換することを特徴とする、請求項5乃至6記載のスクリーニング方法により得られる化合物を有効成分として含有するガンの予防又は治療薬。

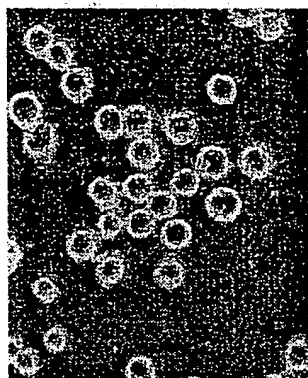
5 11. 未分化型ガンの発生を阻害することを特徴とする、請求項5乃至6記載のスクリーニング方法により得られる化合物を有効成分として含有するガンの予防又は治療薬。

12. 未分化型ガン細胞を分化型ガン細胞に変換する際 p38 を阻害する方法。

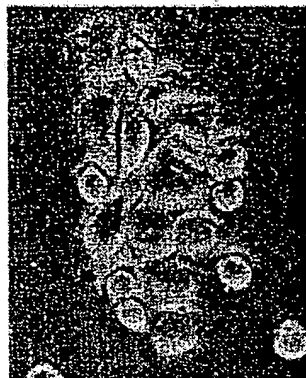
図 面

[図 1]

**NUGC4**

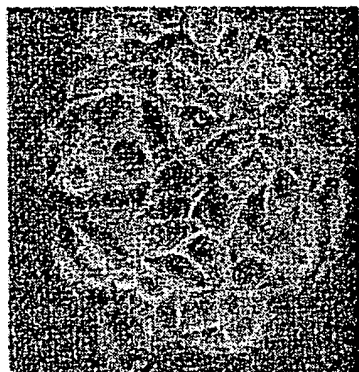


**NUGC4+化合物 A**

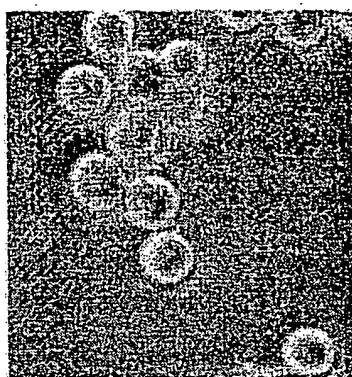


[図 2]

## HCC2998



LacZ



Cre



LacZ

+

化合物A



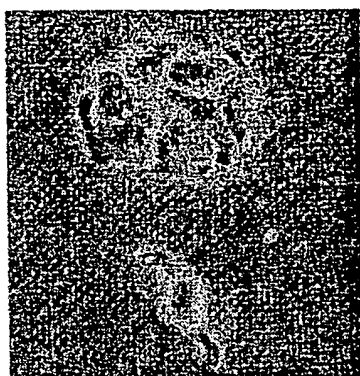
Cre

+

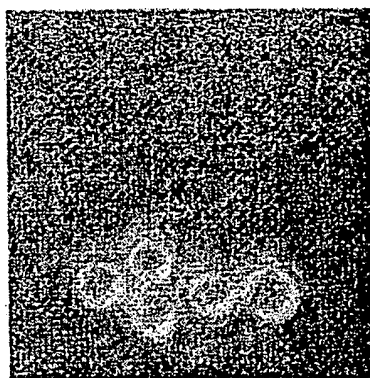
化合物A

[図3]

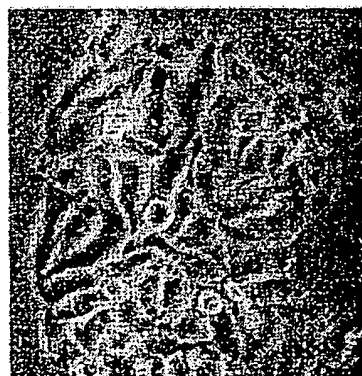
## MKN45



LacZ



Cre



LacZ

+

化合物A



Cre

+

化合物A

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP00/01302

## A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

Int.Cl7 A61K45/00, 31/4439, A61P35/04

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

## B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

Int.Cl7 A61K45/00-08, 31/44-31/529

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

## C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	WO, 98/52937, A (G. D. Searle and Co.),	1
Y	26 November, 1998 (28.11.98),	1-2
A	page 6, line 29 to page 7, line 19; page 50 to 59 & US, 5932576, A	1-4
X	WO, 99/00357, A (Vertex Pharmaceuticals Inc.),	1
Y	07 January, 1999 (07.01.99),	1-2
A	page 54 to 55; Claims 9, 14	1-4
X	WO, 98/27098, A (Vertex Pharmaceuticals Inc.),	1
Y	25 June, 1998 (25.06.98),	1-2
A	page 2, lines 10-23; page 53, line 1 to page 54, line 14; implementation examples 17, 18; Claims 30,37 & US, 5945418, A	1-4
A	WO 99/10325, A (Glaxo Group Limited), 04 March, 1999 (04.03.99)	1-4
A	Simon, C. et al., Inhibition of the p38 mitogen-activated protein kinase by SB 203580 blocks PMA-induced Mr 92,000 type IV collagenase secretion and in vitro invasion., Cancer Res. March 1998, Vol.58, No.6, pp.1135-1139	1-4

☐ Further documents are listed in the continuation of Box C.☐ See patent family annex.

\* Special categories of cited documents:

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

"E" earlier document but published on or after the international filing date

"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art

"&amp;" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search  
29 May, 2000 (29.05.00)Date of mailing of the international search report  
29 May, 2000 (29.05.00)Name and mailing address of the ISA/  
Japanese Patent Office

Authorized officer

Facsimile No.

Telephone No.

Form PCT/ISA/210 (second sheet) (July 1992)

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP00/01302

**Box I Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 1 of first sheet)**

This international search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1. ☒ Claims Nos.: 12  
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:

The subject matter of claim 12 relates to a treatment of the human body by therapy, which does not require an international search report by the International Search Authority in accordance with PCT Article 17(2) (a) (i) and Rule 39.1(iv).

2. ☒ Claims Nos.:  
because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:

Since "p38" as described in claim 1 usually means a protein having a molecular weight of 38 kDa, the term "p38 inhibitors" means inhibitors of a protein having a molecular weight of 38 kDa. Namely, the scope of this term is unclear.

3. ☐ Claims Nos.:  
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

**Box II Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 2 of first sheet)**

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:

1. ☐ As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.
2. ☐ As all searchable claims could be searched without effort justifying an additional fee, this Authority did not invite payment of any additional fee.
3. ☐ As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:
4. ☐ No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:

Remark on Protest ☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest.  
☐ No protest accompanied the payment of additional search fees.

# INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP00/01302

Continuation of Box No. I.2 of continuation of first sheet (1)

In this International Search Report, therefore, prior arts have been examined exclusively relating to "p38MAP kinase inhibitors" including those cited as examples of the p38 inhibitors in the description. The same applies to claims 2 to 4.

Description of claim 5 includes invention relating to a method of culture in the absence of the test compound. Since the subject to be screened is unclear in such invention, it is highly unclear what is to be protected therein. In this International Search Report, therefore, International Search has not been practiced on this claim. The same applies to claims 6 to 11.

## 国際調査報告

国際出願番号 PCT/JPO0/01302

## A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC))

Int. Cl<sup>7</sup> A61K 45/00, 31/4439, A61P 35/04

## B. 調査を行った分野

調査を行った最小限資料 (国際特許分類 (IPC))

Int. Cl<sup>7</sup> A61K 45/00 - 08, 31/44 - 31/529

最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの

国際調査で使用した電子データベース (データベースの名称、調査に使用した用語)

## C. 関連すると認められる文献

引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
X Y A	WO 98/52937 A (G. D. Searle and Co.) 26 November 1998 (26.11.98) 6頁29行~7頁19行、50~59頁 & US 5932576 A	1 1-2 1-4
X Y A	WO 99/00357 A (Vertex Pharmaceuticals Inc.) 7 January 1999 (07.01.99) 54~55頁、クレーム9及び14	1 1-2 1-4
X Y A	WO 98/27098 A (Vertex Pharmaceuticals Inc.) 25 June 1998 (25.06.98) 2頁10~23行、53頁1行~54頁14、実施例17及び18、ク レーム30及び37 & US 5945418 A	1 1-2 1-4

☒ C欄の続きにも文献が列挙されている。☐ パテントファミリーに関する別紙を参照。

## \* 引用文献のカテゴリー

「A」 特に関連のある文献ではなく、一般的技术水準を示すもの

「E」 国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの

「L」 優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献 (理由を付す)

「O」 口頭による開示、使用、展示等に言及する文献

「P」 国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願

の日の後に公表された文献

「T」 国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの

「X」 特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの

「Y」 特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの

「&amp;」 同一パテントファミリー文献

国際調査を完了した日

29.05.00

国際調査報告の発送日

13.06.00

国際調査機関の名称及びあて先

日本国特許庁 (ISA/J P)

郵便番号 100-8915

東京都千代田区霞が関三丁目4番3号

特許庁審査官 (権限のある職員)

大宅 郁治

4C

8829

電話番号 03-3581-1101 内線 3452

様式PCT/ISA/210 (第2ページ) (1998年7月)



## C (続き) . 関連すると認められる文献

引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
A	WO 99/10325 A (Glaxo Group Limited) 4 March 1999 (04.03.99)	1 - 4
A	Simon, C. et.al., Inhibition of the p38 mitogen-activated protein kinase by SB 203580 blocks PMA-induced Mr 92,000 type IV collagenase secretion and in vitro invasion., Cancer Res. March 1998, Vol.58, No.6, pp.1135-1139	1 - 4

## (第 I 欄の続き)

したがって、本国際調査報告においては、明細書中に p 38 阻害剤の例として挙げられたものを包括する「p 38 MAP キナーゼ阻害剤」に限定して先行技術調査を行った。請求の範囲 2-4 についても同様である。

また、請求の範囲 5 の記載は、被検化合物の非存在下培養する方法に係る発明を包含するものであり、斯かる発明においてはスクリーニング対象が不明となることから、保護が求められている事項が著しく不明確である。したがって、本国際調査報告においては、この請求の範囲に関して国際調査は行っていない。請求の範囲 6-11 についても同様である。

**This Page is Inserted by IFW Indexing and Scanning  
Operations and is not part of the Official Record**

**BEST AVAILABLE IMAGES**

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images include but are not limited to the items checked:

- ☐ BLACK BORDERS
- ☐ IMAGE CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES
- ☐ FADED TEXT OR DRAWING
- ☒ BLURRED OR ILLEGIBLE TEXT OR DRAWING
- ☐ SKEWED/SLANTED IMAGES
- ☐ COLOR OR BLACK AND WHITE PHOTOGRAPHS
- ☐ GRAY SCALE DOCUMENTS
- ☐ LINES OR MARKS ON ORIGINAL DOCUMENT
- ☐ REFERENCE(S) OR EXHIBIT(S) SUBMITTED ARE POOR QUALITY
- ☐ OTHER: \_\_\_\_\_

**IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.**

**As rescanning these documents will not correct the image problems checked, please do not report these problems to the IFW Image Problem Mailbox.**